

Prepn. of an anti-haemophilic factor from a cryo-precipitate

Publication number: DE4431833 (C1)

Publication date: 1995-05-18

Inventor(s): WOLTER DIETRICH DR RER NAT [DE] +

Applicant(s): BLUTSPENDEDIENST DER DRK LANDE [DE] +

Classification:


- **international:** **C07K14/755**; A61K38/00; **C07K14/435**; A61K38/00; (IPC1-7): A61K35/16; C07K1/36

- **European:** C07K14/755

Application number: DE19944431833 19940907

Priority number(s): DE19944431833 19940907

Cited documents:

 US4540573 (A)

Abstract of DE 4431833 (C1)

The prepn. of a concentrate of AHF (antihaemophilic factor-Factor VIII) from a cryoppte. comprises: (a) suspending and dissolving the cryoppte.; (b) removing non-AHF proteins and precipitating AHF in a known manner to give a crude AHF paste as a sediment; (c) carrying out a first virus inactivation of the crude AHF paste by heat treatment in the presence of 0.7-1.4 g/ml calcium gluconate and 1.25-1.5 g/ml sucrose pooled concentrate and \- 0.5 mol/l of other protein-stabilising substances chosen from the amino acids glycine, alpha or beta alanine, lysine, leucine, valine, asparagine, serine, hydroxyproline, proline, glutamine, alpha or beta or eta -aminobutyric acid; (d) cooling and diluting with distilled water; (e) carrying out a second virus inactivation using a solvent-detergent (SD) process; (f) purifying the extract by chromatography using a weakly basic anion exchange resin; and (g) ultra filtering and diaconcentrating the extract.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ Patentschrift
①⑩ DE 44 31 833 C 1

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 1/36
A 61 K 35/16

②① Aktenzeichen: P 44 31 833.2-41
②② Anmeldetag: 7. 9. 94
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 18. 5. 95

DE 44 31 833 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

Blutspendedienst der DRK-Landesverbände
Nordrhein und Westfalen-Lippe GmbH, 58097
Hagen, DE

⑦④ Vertreter:

Hoffmeister, H., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
48147 Münster

⑦② Erfinder:

Wolter, Dietrich, Dr.rer.nat., 58097 Hagen, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 45 40 573

⑤④ Verfahren zur Herstellung eines AHF-Konzentrates

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines
Konzentrates des AHF (antihämophilen Faktors - Faktor VIII)
aus Kryopräzipitat, umfassend folgende Schritte:

- (a) Suspendieren und Lösen des Kryopräzipitats,
 - (b) Entfernen von nicht-AHF-Proteinen und Fällung des AHF
in an sich bekannter Weise, wobei eine AHF-Rohpaste als
Sediment enthalten wird,
 - (c) erste Virusinaktivierung der AHF-Rohpaste unter Wärme-
behandlung und in Gegenwart von Calciumglukonat in einer
Menge von 0,7 bis 1,4 g/ml und Saccharose in einer Menge
von 1,25 bis 1,5 g/ml gepooltes Konzentrat und weiterer
eiweißstabilisierender Substanzen, letztere ausgewählt aus
der Gruppe der Aminosäuren: Glycin, α - oder β -Alanin,
Lysin, Leucin, Valin, Asparagin, Serin, Hydroxyprolin, Prolin,
Glutamin, α -, β - oder gamma-Aminobuttersäure, in einer
Menge, die wenigstens eine Konzentration von 0,5 Mol/l
ergibt;
 - (d) Abkühlenlassen und Verdünnen mit aqua dest.;
 - (e) zweite Virusinaktivierung nach dem Solvent-Detergent-
Verfahren (SD-Verfahren),
 - (f) chromatographische Reinigung mit einem schwach basi-
schem Anionenaustauscher-Harz;
 - (g) Ultrafiltration und Diakonzentrierung.
- Dabei steht im Vordergrund die Kompatibilität zweier Viru-
sinaktivierungsschritte (c) und (e) bei hoher Ausbeute.

DE 44 31 833 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Konzentrates des AHF (Antihämophilen Faktors — Faktor VIII) aus einem Kryopräzipitat, das aus humanem Blutplasma gewonnen wurde (vgl. G. Pohl-Cryoprecipitate; its preparation and clinical use; Handbook of Hemophilia; herausgegeben von K. Brinkhouse and H.C. Hemker; Part II 1975).

Es bestehen zahlreiche Patentschriften und andere Publikationen, die Verfahren zur Herstellung eines Konzentrates des antihämophilen Faktors betreffen. Viele der bekannten Verfahren beschreiben Verfahrensschritte

- (a) Suspendieren und Lösen des Kryopräzipitats
- (b) Entfernen von nicht-AHF-Proteinen und Fällung des AHF, wobei eine AHF-Rohpaste gewonnen wird.

Das Bekanntsein der Schritte a und b wird demnach vorausgesetzt.

Nicht-AHF-Proteine können vorzugsweise durch saure Fällung und Adsorption an $\text{Al}(\text{OH})_3$ und Polyethylenglykol-Fällung praktisch vollständig entfernt werden, ohne daß wesentliche Teile des AHF verloren gehen. Derartige Verfahren zur Gewinnung einer AHF-Rohpaste werden als an sich bekannt vorausgesetzt.

Für die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren anzugeben, das besonders wirtschaftlich eine zweifache Virusinaktivierung anwenden läßt, wie sie heute von verschiedenen Anwendern und Gesundheitsbehörden gefordert wird. Dabei soll eine optimale Kombination von Schritten angegeben werden, als deren Ergebnis eine totale Virusinaktivierung und trotzdem eine hohe Ausbeute an AHF erreicht werden.

Bekannt ist, daß gute Ausbeuten an AHF durch "milde" Verfahrensschritte in Verbindung mit einem Hitze-Virusinaktivierungsschritt erreicht werden können. Durch anschließende Gel-Filtration wird ein hochgereinigtes AHF erhalten. Unter Hitze-Virusinaktivierung wird ein Verfahren verstanden, bei dem eine AHF-Rohpaste in Gegenwart von proteinstabilisierenden Substanzen etwa 10 Stunden lang bei 60°C pasteurisiert wird. Derartige Verfahren sind bekannt. Es können gewisse Variationen der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur vorgenommen werden, wobei derartige Variationen im fachmännischen Ermessen liegen.

Zur Verbesserung der bekannten Verfahren kommt es darauf an, vom Prinzip her bekannte Teilverfahren zur AHF-Gewinnung und zur zweifachen Virusinaktivierung derart zu kombinieren und zu variieren, daß ein wesentlicher Ausbeute-Verlust trotz der hintereinandergeschalteten beiden Inaktivierungsschritte nicht eintritt.

Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Suspendieren und Lösen des Kryopräzipitats,
- (b) Entfernen von nicht-AHF-Proteinen und Fällung des AHF in an sich bekannter Weise, wobei eine AHF-Rohpaste als Sediment erhalten wird,
- (c) erste Virusinaktivierung der AHF-Rohpaste unter Wärmebehandlung und in Gegenwart von Calciumglukonat in einer Menge von 0,7 bis 1,4 g/ml und Saccharose in einer Menge von 1,25 bis 1,5 g/ml gepooltes Konzentrat und weiterer eiweißstabilisierender Substanzen, letztere ausge-

- wählt aus der Gruppe der Aminosäuren: Glycin, α - oder β -Alanin, Lysin, Leucin, Valin, Asparagin, Serin, Hydroxyprolin, Prolin, Glutamin, α -, β - oder gamma-Aminobuttersäure, in einer Menge, die wenigstens eine Konzentration von 0,5 Mol/l ergibt;
- (d) Abkühlenlassen und Verdünnen mit aqua dest.;
- (e) zweite Virusinaktivierung nach dem Solvent-Detergent-Verfahren (SD-Verfahren),
- (f) chromatographische Reinigung mit einem schwach basischem Anionenaustauscher-Harz;
- (g) Ultrafiltration und Diakonzentrierung.

Durch die vorgenannten Verfahrensschritte ist es überraschenderweise möglich, hohe Ausbeuten an AHF zu erzielen, obwohl zwei Inaktivierungsschritte hintereinandergeschaltet werden. Wesentlich erscheint, daß die Wärmebehandlung in Gegenwart Calciumglukonat und Saccharose vor sich geht, wobei die Lösung auch noch relativ hohe Anteile an Aminosäuren als eiweißstabilisierende Substanzen enthält. Calciumglukonat und Saccharose sind relativ preiswert und erlauben daher eine wirtschaftliche Herstellung eines Faktor VIII-Präparates.

Der zweite Virusinaktivierungsschritt wird nach dem sogenannten Solvent-Detergent-Verfahren (SD-Verfahren) durchgeführt. Ein solches Verfahren ist bekannt und beispielsweise offenbart im US-Patent 4 540 573. Hierbei wird Tri(N-Butyl)-Phosphat (TNBP) und als Detergent die unter Tween 80 (Polysorbat DAB) bekannte Substanz verwendet. Diese Substanzen werden anschließend wieder entfernt. Dieser Verfahrensschritt zur Virusinaktivierung ist demnach an sich bekannt. Nicht bekannt dagegen ist eine Kombination einer Hitzebehandlung und eines SD-Verfahrens unter den genannten Bedingungen.

Für eine gute Stabilisierung werden gleichzeitig die Aminosäuren Glycin und L-Lysin verwendet, die beide in einer Konzentration von 0,8 bis 1,5 Mol/l, vorzugsweise $1,0 \pm 0,1$ Mol/l vorliegen. Bei wesentlich geringeren Konzentrationen fällt die AHF-Aktivität ab.

Die Wärmebehandlung wird solange durchgeführt, bis in der AHF-Rohpaste möglicherweise vorhandene infektiöse Viren ihre Infektiosität verlieren. Behandelt wird 30 Minuten bis 48 Stunden lang bei einer Temperatur zwischen 50° und 70°C , vorzugsweise 5 bis 15 Stunden bei einer Temperatur von $60^\circ \pm 5^\circ\text{C}$.

Die Erfindung wird anhand eines Beispiels erläutert:

Beispiel

12 kg Kryopräzipitat aus gepooltem Humanplasma wurden in 36 kg aqua dest. suspendiert und extrahiert, das einen Gehalt von 10 IU/g Heparin hatte. Die Temperatur der Suspension lag zwischen 24° und 36°C während des nachfolgenden Rührvorgangs. Die Kryopräzipitat-Suspension wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und 30 min lang gerührt.

Zur Adsorption der Vitamin-K-haltigen Faktoren erfolgte nachfolgend ein Adsorptionsschritt. Der Kryopräzipitat-Suspension wurden 2 kg einer 2-Gew.-% $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Wasser-Suspension hinzugefügt; eine Adsorptionsdauer von 10 min bei 24° bis 36°C wurde abgewartet.

Als nächster Schritt erfolgte eine schonende Fällung der nicht-AHF-Produkte, insbesondere des Fibrinogens, mit Hilfe von Polyethylenglykol. Der Kryopräzipitat- $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension wurden 1,5 kg einer 3 Gew.-%-PEG-4000-Lösung in Wasser zugefügt. Es

folgte eine pH-Einstellung auf 7,15 ($\pm 0,02$) mit 1N-Essigsäure und eine Fällung über 30 min bei 20° ($\pm 2^\circ$) C. Anschließend wurde in einer Becherzentrifuge das entstandene Sediment (5,0 kg) abzentrifugiert; dabei ergaben sich 46,8 kg Überstand. Das Sediment wurde analysiert und anderweitig verarbeitet.

Aus dem gewonnenen Überstand wurde AHF-Rohpaste gewonnen. Der Überstand wurde zunächst mit 13 Gew.-% Glycin bei 20°C 20 min lang verrührt. Anschließend wurden 14 Gew.-% NaCl hinzugefügt und die Mischung weitere 30 min bei 20°C geführt. Die AHF-Rohpaste wurde nun 45 min lang in einer Becherzentrifuge bei etwa 3000 G ($G = \text{Erdbeschleunigung}$) und 15°–18°C zentrifugiert, wobei sich eine Menge von 410 g Sediment und 58,2 kg Überstand ergab.

Es wurde eine Pufferlösung zubereitet aus 10 l aqua dest. mit 0,15 M NaCl, 0,002 M Calciumglukonat-monohydrat und 0,05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan. In einem Verhältnis von 20 kg Pufferlösung zu 1 kg Sediment bei einem pH-Wert von 7,15 ($\pm 0,02$) wurde das Sediment in der Pufferlösung aufgenommen. Die Lösung wurde durch eine 25 μm Nylonlage filtriert und auf 20° ($\pm 1^\circ$) C eingestellt.

Dem gepufferten Sediment wurden 75 g Glycin pro kg gepuffertem Sediment und 183 g L-Lysinmonohydrochlorid pro kg Sediment portionsweise unter vorsichtigem Rühren hinzugefügt, so daß sich eine Konzentration von etwa 1 Mol/l einstellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,25 kg Saccharose pro kg gepuffertem Sediment. Die Temperatur betrug weiterhin um 20°C bei einem pH-Wert von 7,15 ($\pm 0,02$). Die Lösung wurde zum Klären ruhengelassen; entstandener Schaum wurde abgehebert.

Die durch Saccharose- und Glycin-Zusatz proteinstabilisierte Lösung wurde innerhalb von 30 min auf 60° ($\pm 1^\circ$) gebracht und in diesem Temperaturbereich für 10 Stunden gehalten. Anschließend wurde die Lösung unter vorsichtigem Rühren auf 20°C abgekühlt.

Der abgekühlten Lösung wurde eine Verdünnungslösung hinzugefügt, enthaltend auf 50 kg aqua dest. 425 g NaCl, 200 g Calciumgluconat-Monohydrat und 22,4 g $\text{Na}_3\text{-Citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$. Von dieser Verdünnungslösung wurde der abgekühlten, hitzeinaktivierten Lösung die doppelte Menge (Verhältnis 1 : 2) hinzugefügt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Zur Durchführung des 2. Inaktivierungsschrittes wurde der verdünnten Lösung nach dem sogenannten Solvent-Detergent-Verfahren (SD-Verfahren) in bekanntem Verhältnis Polysorbat [TWEEN 80] (DAB) und TNBP hinzugefügt. Das Produkt wurde auf 26°C erwärmt und unter langsamen Rühren 8 Stunden lang inaktiviert. Es erfolgt dann eine Verdünnung und Einstellung der Osmolalität auf etwa $440 \pm 40 \text{ mosmol/l}$.

Das SD-inaktivierte Produkt wurde anschließend auf eine TSK-Fractogel-Säule mit schwach basischen Ionenaustauscher, beispielsweise der Typen CM-650 S/M/C der Produktreihe TOYOPEARL ION EXCHANGE RESINS, aufgetragen und mit einer Pumpengeschwindigkeit von 0,8 l/min über die Säule gepumpt und anschließend in an sich bekannter Weise eluiert. Die Eluate wurden gemischt und mittels Ultrafiltration und Diakonzentrierung konzentriert. Es erfolgte weiterhin eine Einstellung der AHF-Aktivität auf 100 Einheiten pro ml und Abfüllung in 10 ml-Ampullen.

Die in Ampullen abgefüllte Substanz konnte therapeutisch eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Konzentrates des AHF (antihämophilen Faktors – Faktor VIII) aus Kryopräzipitat, umfassend folgende Schritte:

(a) Suspendieren und Lösen des Kryopräzipitats,

(b) Entfernen von nicht-AHF-Proteinen und Fällung des AHF in an sich bekannter Weise, wobei eine AHF-Rohpaste als Sediment erhalten wird,

(c) erste Virusinaktivierung der AHF-Rohpaste unter Wärmebehandlung und in Gegenwart von Calciumglukonat in einer Menge von 0,7 bis 1,4 g/ml und Saccharose in einer Menge von 1,25 bis 1,5 g/ μl gepooltes Konzentrat und weiterer eiweißstabilisierender Substanzen, letztere ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren: Glycin, α - oder β -Alanin, Lysin, Leucin, Valin, Asparagin, Serin, Hydroxyprolin, Prolin, Glutamin, α -, β - oder gamma-Aminobuttersäure, in einer Menge, die wenigstens eine Konzentration von 0,5 Mol/l ergibt;

(d) Abkühlenlassen und Verdünnen mit aqua dest.;

(e) zweite Virusinaktivierung nach dem Solvent-Detergent-Verfahren (SD-Verfahren),

(f) chromatographische Reinigung mit einem schwach basischem Anionenaustauscher-Harz;

(g) Ultrafiltration und Diakonzentrierung.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Calciumglukonat (Schritt c) in Form des Calciumglukonat-Monohydrates zugefügt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Aminosäuren Glycin und L-Lysin gemeinsam und in einer Konzentration von 0,8 bis 1,5 Mol/l zugefügt werden.

- Leerseite -